

AUTOREFERAT



Dr n. med. Kamila Caraballo Cortés
Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych I Pasożytniczych
I Wydział Lekarski
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa, 2019

1. Dane osobowe

Kamila Anna Caraballo Cortés

Adres służbowy:

Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Ul. Pawińskiego 3C

02-106 Warszawa

(22) 572 07 09

kcaraballo@wum.edu.pl

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania

Dyplom ukończenia studiów doktoranckich Studium Medycyny Molekularnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wyróżnieniem, Warszawski Uniwersytet Medyczny, I Wydział Lekarski, zakres biologia medyczna, specjalność: medycyna molekularna, stopień naukowy doktora uzyskany 20.03.2013. Tytuł rozprawy: „Dynamika zmian sekwencji regionu HVR1 wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) we wczesnym okresie leczenia jako czynnik predykcyjny terapii przeciwwirusowej”. Promotor: Prof. dr hab. n. med. Marek Radkowski. Recenzenci: Prof. dr hab. n. med. Iwona Mozer-Lisewska, Prof. dr hab. n. med. Anna Boroń-Kaczmarska.

Dyplom ukończenia studiów jednolitych magisterskich biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biofizyki, Biochemii i Biotechnologii, specjalność: biologia molekularna, tytuł zawodowy magistra uzyskany 24.06.2005. Tytuł pracy: „Properties of chlorophyllase in biphasic solvent system”. Promotor: dr Leszek Fiedor.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Październik 2013-obecnie

adiunkt w Zakładzie Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Listopad 2008-wrzesień 2013

asystent w Zakładzie Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Osiągnięcia naukowe i dydaktyczne:

Autor lub współautor 33 publikacji naukowych

Kierownik siedmiu projektów naukowych, w tym jednego zagranicznego

Odbyte staże naukowe w czterech zagranicznych ośrodkach

Laureat sześciu nagród naukowych

Opiekun lub promotor pracy licencjackiej, czterech prac magisterskich, jednej doktorskiej oraz opiekun koła naukowego

4. Tytuł osiągnięcia naukowego:

a) „Znaczenie kliniczne oraz epidemiologiczne zmienności genetycznej wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) – użyteczność technik NGS”

b) Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe:

1) **Caraballo Cortes K (autor korespondujący)**, Zagordi O, Perlejewski K, Laskus T, Maroszek K, Bukowska-Ośko I, Pawełczyk A, Płoski R, Berak H, Horban A, Radkowski M. Deep sequencing of hepatitis C virus hypervariable region 1 reveals no correlation between genetic heterogeneity and antiviral treatment outcome. BMC Infectious Diseases. 2014;14:1-9.

IF=2,613

2) **Caraballo Cortes K**, Bukowska-Ośko I, Pawełczyk A, Perlejewski K, Płoski R, Lechowicz U., Stawiński P, Demkow U, Laskus T, Radkowski M. Next-Generation sequencing of 5' untranslated region of hepatitis C virus in search of minor viral variant in a patient who revealed new genotype while on antiviral treatment. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2016;885:11-23.

IF=1,937

3) Janiak M, **Caraballo Cortés K (autor korespondujący)**, Perlejewski K, Kubicka-Russel D, Grabarczyk P, Demkow U, Radkowski M. Next-generation sequencing of hepatitis C virus (HCV) mixed-genotype

infections in anti-HCV-negative blood donors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018. DOI: 10.1007/5584_2018_190.

IF=1,760

4) **Caraballo Cortes K (autor korespondujący)**, Zagordi O, Jabłońska J, Pawełczyk A, Kubisa N, Perlejewski K, Bukowska-Ośko I, Płoski R, Radkowski M, Laskus T. Spouse-to-spouse transmission and evolution of hypervariable region 1 and 5' untranslated region of hepatitis C virus analyzed by next-generation sequencing. *PLoS One*. 2016;11(2):e0150311.

IF=2,806

5) **Caraballo Cortes K (autor korespondujący)**, Rosińska M, Janiak M, Stępień M, Zagordi O, Perlejewski K, Osuch S, Pawełczyk A, Bukowska-Ośko I, Płoski R, Grabarczyk P, Laskus T, Radkowski M. Next-generation sequencing analysis of a cluster of hepatitis C virus infections in a haematology and oncology center. *PLoS One*. 2018;13(3):e0194816.0.1371.

IF = 2,766

Sumaryczny IF prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **11,88**

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV), dotyczące ok. 70 mln osób na świecie, wciąż stanowi ważny problem kliniczno-epidemiologiczny. Przewlekły przebieg zakażenia może prowadzić do poważnych następstw, takich jak przewlekłe zapalenie wątroby, niewydolność wątroby oraz rak wątrobowo-komórkowy. Ograniczony dostęp do nowoczesnego leczenia, jak i brak szczepionki, utrudniają eradykację wirusa. Pomimo znacznego postępu w zrozumieniu patogenezы zakażenia HCV, wiele aspektów wciąż pozostaje niejasnych.

Duża zmienność genetyczna HCV jest następstwem braku mechanizmu korekty błędów wirusowej RNA-zależnej polimerazy RNA, szybkiej i masywnej replikacji wirusa oraz rekombinacji. Wyrażona jest ona w postaci zjawiska *quasispecies*, czyli współistnienia populacji wariantów genetycznych, które łączą zależność filogenetyczną. Zmienność genetyczna patogenu nie jest równomierna na całej długości genomu: najbardziej zmienne są sekwencje regionów hiperzmiennych HVR1, HVR2 i HVR3 białka otoczki E2, gdyż kodują epitopy rozpoznawane przez komórki układu immunologicznego. W następstwie, wysoka zmienność HCV sprzyja adaptacji patogenu w zmieniających się warunkach środowiska, w szczególności unikaniu odpowiedzi immunologicznej. Duża zmienność genów kodujących białka immunogennej

wirusowej otoczki oraz ich szybka ewolucja może umożliwić przetrwanie zakażenia. Ponadto wykazano, że wyższa liczba wariantów genetycznych genów otoczki wirusowej jest związana z mniejszymi szansami na powodzenie leczenia interferonem i rybawiryną. Poziom zmienności genetycznej HCV wydaje się więc mieć duże znaczenie kliniczne. Podobnie, zmienność genów kodujących białka enzymatyczne wirusa może być związana z lekoopornością na celowane leki wobec HCV (DAA, direct-acting antivirals). Badanie zjawiska zmienności HCV jest kluczowe dla zrozumienia patogenezы zakażenia, a w wymiarze praktycznym może przyczynić się do indywidualizacji leczenia i opracowania szczepionki. Co więcej, analiza filogenetyczna szczepów HCV znajduje zastosowanie w badaniu epidemiologicznych aspektów rozprzestrzeniania się zakażenia. Istnieje wiele trudności w badaniu tego zjawiska, co wynika głównie z subklinicznego przebiegu zakażenia oraz rozpowszechnienia HCV wśród grup wysokiego ryzyka infekcji, od których dostępność próbek jest ograniczona. Ponadto, wymaga ono użycia zaawansowanych metod molekularnych oraz analiz bioinformatycznych, które mogą zweryfikować pokrewieństwo szczepów HCV. Transmisja HCV w następstwie ekspozycji parenteralnej lub seksualnej była przedmiotem kilku badań analizy podobieństwa szczepów. Jednak, w większości z nich, podobieństwo oceniano badając tylko sekwencje najliczniejszego wariantu u danego nosiciela zakażenia lub na podstawie kilku sklonowanych sekwencji, które skąpo odzwierciedlają pełny skład wariantów genetycznych. Całe spektrum populacji wirusa może być bardziej przydatne dla ustalenia związków epidemiologicznych, gdyż szybka dynamika replikacji HCV i odpowiedź immunologiczna może prowadzić do zmniejszenia udziału oryginalnych szczepów, którymi doszło do zakażenia. Ponadto, jak wykazano, zakażenie u „biorcy” może być inicjowane zaledwie przez jeden niszowy wariant „dawcy”, tworząc ryzyko braku jego wykrycia za pomocą niewystarczająco czułych metod.

Do niedawna, wierne odzwierciedlenie zmienności genetycznej populacji wirusa w zakażonym organizmie było znacznie utrudnione. Wynikało to w dużej mierze z ograniczeń metodologicznych stosowanych technik elektroforetycznych takich jak np. SSCP (*ang. single strand conformational polymorphism*) lub klonowania i sekwencjonowania metodą Sangera, które umożliwiają wykrywanie zaledwie najliczniej reprezentowanych wariantów genetycznych w populacji *quasispecies*. Jednakże, SSCP nie informuje o składzie nukleotydowym sekwencji, rodzaju zmian genetycznych lub dystansie genetycznym pomiędzy wariantami. Klonowanie i sekwencjonowanie zaś są procedurami czasochłonnymi, wymagającymi analizy wielu klonów, by wierne odzwierciedlić skład populacji. W przeciwieństwie do tych ograniczeń, technika sekwencjonowania następnej generacji (NGS) oferuje niespotykaną dotąd czułość wykrywania „niszowych” wariantów w złożonej populacji genetycznej, umożliwiając odzwierciedlenie zjawiska *quasispecies*. Równoległe sekwencjonowanie całej biblioteki DNA zawartej w próbce pozwala na uzyskanie milionów sekwencji jednocześnie, ułatwiając wykrycie wariantów „niszowych” i zbadanie proporcji między nimi. Niemniej jednak, w celu dokonania wiarygodnej rekonstrukcji wariantów z

„surowych” wyników, wymagana jest odpowiednia analiza danych. Technika ta znalazła już zastosowanie w szczegółowej analizie zmienności wirusów RNA, głównie w badaniach nad HIV-1.

Wierna i dogłębna rekonstrukcja populacji genetycznej HVR1 HCV za pomocą metody NGS oraz odpowiednich metod bioinformatycznych była jednym z celów mojej pracy doktorskiej oraz publikacji (Caraballo Cortes K et al., Biomed Res Int. 2013; 626083). Osiągnięto to poprzez zastosowanie dużego „pokrycia”, czyli liczby otrzymanych odczytów sekwencji, z zamiarem uzyskania informacji o składzie nukleotydowym oraz odsetku zarówno głównych, jak i niszowych wariantów wirusa. Jednakże, biorąc pod uwagę ograniczenia metody, wynikające przede wszystkim z błędów amplifikacji materiału genetycznego oraz sekwencjonowania, wymagana była odpowiednia korekta tych zjawisk z użyciem narzędzi bioinformatycznych. W tym celu nawiązałam współpracę z twórcą programu ShoRAH (ang. The Short Reads Assembly into Haplotypes) – bioinformatykiem dr Osvaldo Zagordim z Uniwersytetu z Zurychu. Program ten opiera się na zasadzie prawdopodobieństwa *a posteriori* istnienia wariantów genetycznych zgodnych z teorią wnioskowania bayesowskiego. Zoptymalizowana wspólnie metoda pozwoliła na rekonstrukcję wariantów o odsetku co najmniej 0,02%, co potwierdzono w dwóch niezależnych iteracjach programu. W wyniku rekonstrukcji ShoRAH, najczęstsze warianty HVR1 podczas przewlekłej fazy zakażenia stanowiły stosunkowo niewielki odsetek populacji: najbardziej liczny wariant stanowił zaledwie 10,5%, a tylko 17 haplotypów było obecnych w odsetku wyższym niż 1%. Dane te sugerują, że populacja *quasispecies* w przewlekłym zakażeniu HCV jest wysoce rozproszona na mało liczne warianty, bez dominujących sekwencji. Wypracowany „workflow” pozwolił na jego zastosowanie do celów przedstawionego osiągnięcia naukowego.

Wyznaczonymi celami osiągnięcia naukowego były:

- 1) określenie wpływu parametrów zmienności genetycznej HCV, odzwierciedlonej za pomocą NGS, na skuteczność leczenia przeciwwirusowego pegylowanym interferonem alfa oraz rybawiryną;
- 2) analiza filogenetyczna szczepów HCV – zbadanie motywów molekularnych rozprzestrzeniania się zakażenia z wykorzystaniem metody NGS;
- 3) analiza zjawiska zakażeń mieszanymi genotypami HCV z wykorzystaniem metody NGS.

Powyższe cele zrealizowano i opisano w następujących pracach:

- 1) **Caraballo Cortés K (autor korespondujący)**, Zagordi O, Perlejewski K, Laskus T, Maroszek K, Bukowska-Ośko I, Pawełczyk A, Płoski R, Berak H, Horban A, Radkowski M. Deep sequencing of hepatitis C virus hypervariable region 1 reveals no correlation between genetic heterogeneity and antiviral treatment outcome. BMC Infect Dis. 2014 Jul 13; 14:389. doi: 10.1186/1471-2334-14-389.

Mimo ogromnego postępu w dziedzinie leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu C, stan wiedzy o znaczeniu zmienności genetycznej wirusa i jej wpływie na skuteczność leczenia jest niesatysfakcjonujący. Nowe schematy terapeutyczne z udziałem leków o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym (DAA), dostępne od niedawna, zapewniają niemal 100% skuteczność. Natomiast, jak dotychczas rutynowo stosowane protokoły leczenia z zastosowaniem interferonu i rybawiryny, oparte na immunomodulacji, miały ograniczoną skuteczność i poważne skutki uboczne, które często wymagały przedwczesnego przerwania terapii. Z tego względu, w wielu ośrodkach naukowych na świecie poszukiwano czynników wirusowych bądź osobniczych, które mogłyby zostać wykorzystane w praktyce klinicznej do rokowania skuteczności leczenia. Znane czynniki determinujące wynik leczenia obejmują zarówno te osobnicze (tj. polimorfizmy genu IL28B, rasa, płeć, wiek), jak i wirusologiczne (genotyp, subtyp, poziom wirēmii). Region hiperzmienny 1 (HVR1) białka E2 HCV koduje ważne epitopy dla komórek układu immunologicznego, zatem jego zmienność może mieć wpływ na unikanie odpowiedzi immunologicznej modulowanej przez interferon. Heterogenność HVR1 mogłaby przyczynić się do niepowodzenia leczenia, gdyż koegzystencja wielu wariantów antygenowych może zwiększyć prawdopodobieństwo selekcji tych skutecznie unikających presji leczenia. Jednakże, wyniki poprzednich badań korelujących zmienność HVR1 z wynikiem leczenia były zwykle niejednoznaczne, a czasami nawet sprzeczne. Rozbieżności te mogą być częściowo spowodowane stosowaniem różnych technik charakteryzujących się odmienną czułością.

W moim badaniu wykorzystano unikalną kolekcję próbek surowicy pobranych podczas leczenia przewlekłego zakażenia genotypem 1b HCV pegylowanym interferonem α (PEG-IFN α) i rybawiryną do zbadania zmienności genetycznej wariantów HVR1 z zastosowaniem pirosekwencjonowania. Wykazano, że złożoność (liczba wariantów genetycznych), entropia Shannona, zmienność nukleotydowa Π , dystans genetyczny i liczba substytucji nie różniły się znacząco między reagującymi i niereagującymi na leczenie. Brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy odpowiadającymi i niereagującymi na leczenie sugeruje, że heterogenność HVR1 wykrywana przez głębokie sekwencjonowanie nie ma wpływu na wynik leczenia. Alternatywnie można spekulować, że analizowana głębokość jest nadal niewystarczająca do wykrycia niszowych wariantów, których zmienność miałaby znaczenie kliniczne.

Drugim aspektem pracy było podjęcie problemu błędu sekwencjonowania, wpływającego na wiarygodne wykrycie niszowych wariantów populacji quasispecies. W eksperymencie z zastosowaniem kontroli wewnętrznej przy użyciu sklonowanego HVR1 wykazano błąd sekwencjonowania na poziomie 0,05% na nukleotyd, składający się głównie z insercji, występujących przeważnie w regionach homopolimerowych. Ten wskaźnik błędu przyczynił się do 4% błędnych odczytów sekwencji, najliczniejszy błędny wariant wystąpił w odsetku 1,48%. Aby zminimalizować ryzyko włączenia błędnych wariantów do analizy, zastosowano rekonstrukcję błędów dostępną w programie ShoRAH, która pozwoliła na korektę 99% odczytów, redukując zarówno bezwzględną liczbę, jak i odsetek błędnych wariantów. Tak więc, metody

korekty błędów powinny być stosowane w celu ułatwienia analizy niszowych wariantów za pomocą pirosekwencjonowania.

2) **Caraballo Cortes K (autor korespondujący)**, Bukowska-Ośko I, Pawełczyk A, Perlejewski K, Płoski R, Lechowicz U, Stawiński P, Demkow U, Laskus T, Radkowski M. Next-generation sequencing of 5' untranslated region of hepatitis C virus in search of minor viral variant in a patient who revealed new genotype while on antiviral treatment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016;885:11-23.

Zakażenie mieszane (więcej, niż jednym genotypem HCV) występuje u 5-10% wszystkich nosicieli wirusa. Jednakże, jego rola w przetrwaniu zakażenia, skuteczności leczenia i tropizmie tkankowym jest niejasna. Jak dotychczas, opracowano różne metody oznaczania genotypu HCV. Większość opiera się na amplifikacji określonych regionów (głównie 5'-UTR, regionu 5' nieulegającego translacji) i wykrywaniu specyficznych różnic sekwencji za pomocą analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), metod hybrydyzacji DNA lub klasycznego sekwencjonowania. Jednakże, metody te wykrywają zwykle dominujący genotyp wirusa. Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS), które umożliwia analizę dużych, zróżnicowanych genetycznie populacji, oferuje niezrównane dotąd możliwości w badaniu tego zjawiska.

Celem badania było ustalenie, za pomocą dwóch różnych metod głębokiego sekwencjonowania (pirosekwencjonowania - 454 Life Sciences / Roche oraz sekwencjonowania poprzez syntezę - Illumina), czy szczep genotypu 4, przejściowo wykrywany w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) u pacjenta zakażonego genotypem 1b, poddawanego terapii przeciwwirusowej interferonem i rybawiryną, reprezentował wcześniej istniejącą niewielką populację wirusa, która została wyselekcjonowana w wyniku leczenia, czy był wynikiem nadkażenia ograniczonego do przedziału PBMC. Po drugie, porównaliśmy warianty regionu 5'-UTR wirusa uzyskane za pomocą dwóch podejść NGS. W tym celu produkty amplifikacji regionu 5'-UTR z 9 próbek pobranych przed, podczas i po leczeniu (4 próbki surowicy i 5 próbek PBMC) poddano sekwencjonowaniu. Sekwencjonowanie ujawniło obecność dwóch (454 / Roche) i jednego (Illumina) wariantu genotypu 4 w PBMC w 16. tygodniu leczenia. Jak wykazały obie platformy sekwencjonujące, żaden z tych wariantów nie był obecny we wcześniej lub później pobranych próbkach, co sugeruje, że doszło do nadkażenia. Sekwencjonowanie 454 / Roche wykryło 24 różne warianty 5'-UTR: 8 było obecnych w surowicy i PBMC, 4 tylko w surowicy i 12 tylko w PBMC. Sekwencjonowanie Illumina wykryło 11 różnych wariantów 5'-UTR: 5 w surowicy i PBMC, 4 tylko w surowicy i 2 tylko w PBMC. Sześć wariantów było identycznych dla obu platform sekwencjonowania. Różnica w liczbie wariantów wynikała przede wszystkim ze zmienności w dwóch krótkich regionach homopolimerowych 5'-UTR. Ponieważ Illumina generuje błędy w homopolimerach dłuższych niż 20 powtórzeń, wydaje się, że warianty homopolimerowe uzyskane przez tę platformę są bardziej wiarygodne.

Analiza wariantów z obu platform sekwencjonowania wykazała, że populacja wirusa po leczeniu była bardzo podobna do tej sprzed leczenia pod względem sekwencji i liczby wariantów oraz ich proporcjonalnego rozkładu ilościowego. Tak więc, po ustaniu presji selekcyjnej spowodowanej leczeniem, skład *quasispecies* powrócił do pierwotnego wzorca.

Podsumowując, analiza wariantów HCV, wykorzystująca dwie niezależne metody głębokiego sekwencjonowania sugeruje, że przejściowa obecność innego szczepu genotypowego w PBMC była prawdopodobnie wynikiem nadkażenia, a nie selekcji niszowego wariantu.

3) Janiak M, **Carballo Cortés K (autor korespondujący)**, Perlejewski K, Kubicka-Russel D, Grabarczyk P, Demkow U, Radkowski M. Next-Generation sequencing of hepatitis C virus (HCV) mixed-genotype infections in anti-HCV-negative blood donors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018. DOI: 10.1007/5584_2018_190.

Zakażenie więcej niż jednym genotypem HCV (zakażenie mieszane) jest istotnym zjawiskiem epidemiologicznym, szczególnie u osób z wysokim ryzykiem wielokrotnych ekspozycji. Częstość mieszanych zakażeń HCV w tej samej grupie pacjentów różni się w zależności od zastosowanych testów rutynowych genotypujących HCV. Wysoką czułość wykrywania genotypu HCV można osiągnąć poprzez sekwencjonowanie następnej generacji (NGS). Celem tego badania było określenie częstości występowania mieszanego zakażenia HCV u HCV-RNA-dodatnich, anty-HCV-ujemnych dawców krwi za pomocą pirosekwencjonowania i porównanie wyników ze standardową metodą genotypowania. Badanie obejmowało 99 próbek surowicy zebranych w latach 1999-2015 od dawców zakażonych genotypami 1 i 3: 1a - 5 (5,1%); 1b - 42 (42,4%); 3a - 52 (52,5%). Rutynowo, genotyp został określony za pomocą testów Versant HCV Genotype lub Versant HCV Genotype 2.0, gdzie we wszystkich próbkach wykazano pojedynczy genotyp HCV. Za pomocą NGS otrzymano 381 063 odczytów 5'UTR z 76 próbek. W jednej próbce, gdzie wykryto genotyp wyłącznie 3a, NGS wykazał obecność dwóch genotypów: dominującego 3a i niszowego (odsetek 5.2%) 1b. Te rozbieżności były prawdopodobnie spowodowane ograniczoną czułością rutynowo stosowanych testów. Ponadto, podczas gdy w dwóch próbkach rutynowy test wykrył genotypy 1a i 3a, NGS ujawnił odpowiednio genotypy 1b i 4a. Brak poprawnego różnicowania między genotypami HCV były już poprzednio opisane w literaturze. Takie błędy mogą prowadzić do nieoptymalnego leczenia przeciwwirusowego, które jest dobierane na podstawie obecnego genotypu. Podsumowując, NGS umożliwia dokładną identyfikację zakażeń mieszanych HCV, które nie są wykrywane przez metody rutynowe.

4) **Caraballo Cortes K (autor korespondujący)**, Zagordi O, Jabłońska J, Pawełczyk A, Kubisa N, Perlejewski K, Bukowska-Ośko I, Płoski R, Radkowski M, Laskus T. Spouse-to-spouse transmission and evolution of hypervariable region 1 and 5' untranslated region of hepatitis C virus analyzed by next-generation sequencing. PLoS One. 2016;11(2):e0150311.

Ryzyko transmisji HCV na członków rodziny, w tym rodzeństwo, rodziców, potomstwo oraz partnerów homo- i heteroseksualnych jest dobrze udokumentowane. Narażenie na zakażenie jest wysokie, ponieważ ponad 50% partnerów seksualnych pacjentów z przewlekłym WZW typu C (pWZW C) rozwija swoistą odporność komórkową na wirusa bez równoczesnej serokonwersji lub obecności HCV-RNA w surowicy. Rozpowszechnienie zakażenia HCV wśród członków rodziny zakażonych pacjentów jest bardzo zróżnicowane, wynosząc od 1,3% do 36,4% i zależy od badanej populacji.

Molekularna charakterystyka ognisk transmisji HCV pozostaje wyzwaniem ze względu na długie okresy inkubacji, bezobjawowy przebieg zakażenia i ograniczony dostęp do próbek od „dawcy” i „biorcy” wirusa w okresie transmisji. U około 40% zakażeń HCV, nie można zidentyfikować wyraźnego czynnika ryzyka zakażenia. Potwierdzenie wystąpienia transmisji można wykazać wysoką homologią między genomami HCV. Niemniej jednak, wymaga to zastosowania odpowiednio czułych technik sekwencjonowania.

Celem badania było wykorzystanie NGS do analizy transmisji i selekcji wariantów 1b HCV od przewlekle zakażonej małżonki („dawcy”) do jej współmałżonka („biorcy”), który rozwinął zakażenie ostre objawowe, a następnie przewlekłe. Zbadano dwa różne regiony genomowe HCV: HVR1 i 5'UTR. Dodatkowo, jako kontrole do celów analizy filogenetycznej wykorzystano surowice od 10 losowo wybranych pacjentów z pWZW C tego samego genotypu i subtypu (1b HCV).

Mimo, że nie zidentyfikowano identycznych wariantów HVR1 obecnych u obojga małżonków w pierwszej badanej próbce, jeden wariant „dawcy” (odsetek 1,7%) okazał się być blisko spokrewniony ze wszystkimi wariantami obecnymi u „biorcy” (97,1% - 98,3% podobieństwa sekwencji). Analiza filogenetyczna wykazała znacznie większe podobieństwo między szczepami HCV u małżonków, niż między niespokrewnionymi pacjentami z pWZW C, potwierdzając wystąpienie rodzinnej transmisji. Zgodnie z naszą najlepszą wiedzą, to badanie było pierwszym z zastosowaniem NGS, gdzie wykazano transmisję wirusa HCV przez wariant o niszowym udziale w populacji. Co ważne, wariant ten zostałby prawdopodobnie nie wykryty przy użyciu klasycznego sekwencjonowania metodą Sangera, gdyż wymagałoby to sekwencjonowania 175 klonów w celu jego wykrycia z prawdopodobieństwem 95%. Ta obserwacja ma szczególne znaczenie dla badań transmisji wirusa, ponieważ cechy podobieństwa populacji wirusów mogą zostać utracone, szczególnie, gdy używa się klasycznych technik sekwencjonowania.

Ewolucja molekularna HCV HVR1 była znacząco różna u pary małżonków. Populacja „biorcy” wykazała zwiększającą się złożoność (liczbę wariantów) w czasie, a także zmianę w składzie wariantów, zaledwie

kilkoma wariantami dominującymi. Taki obraz jest również charakterystyczny dla wirusa grypy oraz HIV-1 i może być wynikiem presji selekcyjnej układu immunologicznego. Ponadto, zaobserwowano wyraźne zmiany sekwencji aminokwasów w obrębie analizowanych epitopów dla neutralizujących przeciwciał w czasie. Ta obserwacja jest zgodna z teorią selekcji immunologiczną w ostrym zakażeniu HCV.

Przeciwnie, większość wariantów u „dawcy” była obecna w kolejnych próbkach, często w większym odsetku, niż w próbkach poprzednich. Mogło być to następstwem adaptacji wirusa i / lub ograniczeniem presji selekcyjnej układu immunologicznego, prawdopodobnie spowodowanego wyczerpaniem immunologicznym, które jest powszechne w przewlekłym zakażeniu HCV. Podobnie, skład aminokwasowy w obrębie dwóch epitopów HVR1 był w dużej mierze zachowany w kolejnych próbkach. Podczas gdy sekwencja HVR1 podlegała zmianom, sekwencja 5'UTR pozostawała względnie stabilna w czasie u obu badanych, prawdopodobnie z powodu braku selekcyjnych presji.

Podsumowując, wydaje się, że za wewnątrzrodzinną transmisję HCV może być odpowiedzialny niszowy wariant, zatem badanie tego zjawiska wymaga zastosowania metod o wysokiej czułości, takich jak NGS.

5) Caraballo Cortes K (autor korespondujący), Rosińska M, Janiak M, Stępień M, Zagordi O, Perlejewski K, Osuch S, Pawełczyk A, Bukowska-Ośko I, Płoski R, Grabarczyk P, Laskus T, Radkowski M. Next-generation sequencing analysis of a cluster of hepatitis C virus infections in a haematology and oncology center. PLoS One. 2018;13(3):e0194816.0.1371.

W pracy wykorzystałam możliwość dogłębnego zbadania różnorodności genetycznej HVR1 HCV we wczesnych stadiach zakażenia, analizując ognisko infekcji u grupy dziesięciu pacjentów regionalnego ośrodka hematologii i onkologii na południu Polski, u których wykryto HCV RNA od dwóch do czterech miesięcy od hospitalizacji. Tylko u dwóch z dziesięciu pacjentów wykazano w chwili badania obecność przeciwciał anty-HCV. Region HVR1 został zamplifikowany u siedmiu pacjentów (w tym u jednego o statusie anty-HCV+) i zsekwencjonowany (NGS). Dokonano rekonstrukcji wariantów genetycznych za pomocą programu ShoRAH, a uzyskane sekwencje porównano za pomocą analiz filogenetycznych i różnorodności genetycznej. Jako kontrole wykorzystano surowicę krwi dziesięciu niespokrewnionych dawców krwi z nowo nabytym zakażeniem HCV (HCV RNA +, anty-HCV-).

U każdego pacjenta wykazano obecność od jednego do siedmiu wariantów HVR1, co kontrastuje z dużą ich liczbą obserwowaną podczas przewlekłego zakażenia. Ta niska złożoność prawdopodobnie odzwierciedla efekt „wąskiego gardła” podczas transmisji i sugeruje, że zakażenie zostało zainicjowane jednym wariantem, który musiał być bardzo podobny lub nawet identyczny z sekwencją konsensusową (wypadkowa wszystkich sekwencji pacjentów). Ponadto, struktura populacji HVR1 była w większości przypadków „wąska” (jeden dominujący wariant + niszowe warianty o odsetku <10%), co jest również

zgodne z niedawno nabytym zakażeniem. Sekwencje pacjentów były filogenetycznie spokrewnione i jednocześnie bardziej podobne do siebie (podobieństwo 95,4% do 100,0%) niż do tych u kontroli (podobieństwo 64,8% do 82,6%). Identyczny dominujący wariant występował u czterech pacjentów, podczas gdy inne blisko spokrewnione warianty dominowały u pozostałych trzech pacjentów. U pięciu pacjentów populacja HCV była ograniczona do pojedynczego wariantu lub jednego dominującego wariantu i wariantów o odsetku mniejszym, niż 10%. U pięciu z siedmiu pacjentów analiza filogenetyczna była zgodna z modelem typu „star-like” lub nie było obecnych więcej niż dwóch wariantów (w tym jeden dominujący a drugi niszowy), co sugeruje zakażenie jednym „wariantem-założycielem”. Podsumowując, analiza NGS ogniska zakażenia HCV nabytego w warunkach szpitalnych ujawniła obecność bardzo blisko spokrewnionych wariantów o niskiej różnorodności u wszystkich pacjentów, co sugeruje wczesne zakażenie tym samym szczepem wirusa. NGS w połączeniu z analizą filogenetyczną oraz klasyczna analiza epidemiologiczna może pomóc w śledzeniu ognisk zakażenia HCV.

Podsumowanie:

W powyższym cyklu publikacji przedstawiono innowacyjne podejście oparte na wykorzystaniu techniki NGS do badania znaczenia klinicznego i epidemiologicznego zmienności genetycznej HCV. Udowodniona użyteczność techniki NGS może stanowić punkt wyjścia do dalszych badań nad znaczeniem zmienności genetycznej wirusowych patogenów człowieka.

Za najważniejsze osiągnięcia w przedstawionym cyklu uważam:

- wykazanie, za pomocą NGS, dużego spektrum zmienności genetycznej HCV podczas zakażenia, niemożliwego do ukazania za pomocą klasycznych technik sekwencjonowania;
- zastosowanie nowego narzędzia do wykazania braku znaczenia dogłębnej zmienności HVR1 HCV na skuteczność leczenia przeciwwirusowego;
- wykazanie, za pomocą NGS, istnienia zjawiska zakażeń mieszanymi genotypami HCV, które nie są wykrywane przez metody rutynowe ze względu na ograniczoną czułość;
- wykazanie użyteczności NGS do dowodzenia ognisk zakażenia HCV;
- identyfikacja molekularnych motywów transmisji i ewolucji HCV, w tym potencjalnego znaczenia szczepów niszowych, które mogą być niewykrywalne za pomocą klasycznych technik sekwencjonowania.

5. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego

Łącznie z przedstawionymi publikacjami wchodzącymi w skład osiągnięcia naukowego jestem współautorem 27 pełnotekstowych prac oryginalnych (w tym 23 z IF), 1 opisu przypadku oraz 5 prac poglądowych.

Łączny IF: 70,24

Całkowita liczba cytowań (wg ISI Web of Science Core Collection) z dnia 21.11.2018 (bez autocytowań) =
86

Indeks Hirscha = 6

Szczegółowe dane bibliometryczne znajdują się w załączniku nr 4.

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

6.1. Pozostałe prace

Obok prac wchodzących w skład cyklu publikacji jestem współautorem prac badawczych, które dotyczą tematyki wirusowych zakażeń u ludzi. Łączny IF pozostałych prac to **58,36**. W większości z nich zastosowano nowoczesne metody badawcze m. in. PCR, SSCP, klonowanie, sekwencjonowanie (Sangera, NGS), cytometrię przepływową i barwienia immunohistochemiczne. Sposoby wykorzystania techniki NGS, jak również analizę bioinformatyczną danych sekwencjonowania nieustannie doskonalę. W ostatnim czasie, obiektem moich równoległych zainteresowań badawczych stała się wieloparametryczna cytometria przepływowa.

a) Patogeneza i leczenie zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C

W wymienionych pracach analizowano zmienność genetyczną HCV (sekwencji 5'UTR oraz HVR1 białka E2), zjawisko zakażeń mieszanymi genotypami HCV, zjawisko koinfekcji HIV oraz pozawątrobową lokalizację HCV w kontekście leczenia przeciwwirusowego interferonem alfa i rybawiryną.

Wybrane publikacje:

Bukowska-Ośko I, Perlejewski K, **Caraballo Cortés K**, Pollak A, Berak H, Pawełczyk A, Horban A, Kosińska J, Płoski R, Laskus T, Radkowski M. Next-generation sequencing analysis of new genotypes appearing during antiviral treatment of chronic hepatitis C reveals that these are selected from pre-existing minor strains. *Journal of General Virology*. 2018 DOI: 10.1099/jgv.0.001160.

Bukowska-Ośko I, **Caraballo Cortes K**, Pawełczyk A, Płoski R, Fic M, Perlejewski K, Demkow U, Berak H, Horban A, Laskus T, Radkowski M. Analysis of genotype 1b hepatitis C virus IRES in serum and peripheral

blood mononuclear cells in patients treated with interferon and ribavirin. *BioMed Research International*. 2014;2014:1-7.

Bukowska-Ośko I, Pawełczyk A, Perlejewski K, Kubisa N, **Carballo Cortes K**, Rosińska M, Płoski R, Fic M, Kaźmierczak J, Popiel M, Ząbek P, Horban A, Radkowski M, Laskus T. Genetic variability of hepatitis C virus (HCV) 5' untranslated region in HIV/HCV coinfecting patients treated with pegylated interferon and ribavirin. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125604.

Bukowska-Ośko I, Radkowski M, Pawełczyk A, Rosinska M, **Carballo Cortes K**, Płoski R, Berak H, Horban A, Stanczak J, Fic M, Laskus T. Hepatitis C virus 5' untranslated region variability correlates with treatment outcome. *Journal of Viral Hepatitis*. 2014;21(8):551-559.

Carballo Cortes K (autor korespondujący), Zagordi O, Laskus T, Płoski R, Bukowska-Ośko I, Pawełczyk A, Berak H, Radkowski M. Ultradeep pyrosequencing of hepatitis C virus hypervariable region 1 in quasispecies analysis. *BioMed Research International*. 2013;2013:1-10.

Carballo Cortes K (autor korespondujący), Laskus T, Bukowska-Ośko I, Pawełczyk A, Berak H, Horban A, Fic M, Radkowski M. Variability of hepatitis C virus hypervariable region 1 (HVR-1) during the early phase of pegylated interferon and ribavirin therapy. *Advances in Medical Sciences*. 2012;57(2):370-374.

Carballo Cortes K (autor korespondujący), Bukowska-Ośko I, Pawełczyk A, Berak H, Fic M, Horban A, Radkowski M. Analiza porównawcza regionu 5'UTR oraz HVR1 wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) w surowicy i komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) we wczesnej fazie leczenia interferonem i rybawiryną. *Przegląd Epidemiologiczny*. 2011;65(2):319-324.

b) Aktywacja układu immunologicznego w odpowiedzi na zakażenie HCV

W badaniach tych weryfikowano znaczenie odpowiedzi immunologicznej w kontekście leczenia oraz badano obecność pobudzenia odpowiedzi immunologicznej po udanym kursie terapii przeciwwirusowej. Potwierdzają one kluczowe znaczenie odpowiedzi immunologicznej warunkującej eliminację zakażenia.

Wybrane publikacje:

Jabłońska J, Pawłowski T, Laskus T, Zalewska M, Inglot M, Osowska S, Perlejewski K, Bukowska-Ośko I, **Caraballo Cortes K**, Pawełczyk A, Ząbek P, Radkowski M. The correlation between pretreatment cytokine expression patterns in peripheral blood mononuclear cells with chronic hepatitis C outcome. *BMC Infectious Diseases*. 2015;15:1-8.

Radkowski M, Opoka-Kegler J, **Caraballo Cortes K**, Bukowska-Ośko I, Perlejewski K, Pawełczyk A, Laskus T. Evidence for immune activation in patients with residual hepatitis C virus RNA long after successful treatment with IFN and ribavirin. *Journal of General Virology*. 2014;95(9):2004-2009.

c) Pozawątrobowa replikacja HCV

W przedstawionych pracach badano replikację HCV w lokalizacjach pozawątrobowych, takich jak komórki jednojądrzaste krwi obwodowej oraz komórki szpiku kostnego u chorych z zaburzeniami hematologicznymi przy pomocy metody molekularnej oraz immunohistochemicznej.

Wybrane publikacje:

Kisiel E, Radkowski M, Pawełczyk A, Horban A, Stańczak J, Bukowska-Ośko I, **Caraballo Cortes K**, Kaźmierczak J, Popiel M, Laskus T. Seronegative hepatitis C virus infection in patients with lymphoproliferative disorders. *Journal of Viral Hepatitis*. 2014;21(6):424-429.

Pawełczyk A, Kubisa N, Jabłońska J, Bukowska-Ośko I, **Caraballo Cortes K**, Fic M, Laskus T, Radkowski M. Detection of hepatitis C virus (HCV) negative strand RNA and NS3 protein in peripheral blood mononuclear cells (PBMC): CD3+, CD14+ and CD19+. *Virology Journal*. 2013;10:1-6.

Pawełczyk A, Polańska M, Kisiel E, Chmielewski M, Bukowska-Ośko I, **Caraballo Cortes K**, Fic M, Warzocha K, Radkowski M. An analysis of HCV nonstructural NS3 protein expression in bone marrow cells of HCV-infected patients with hematological disorders. *Experimental and Clinical Hepatology*. 2009;5(3-4):44-46.

d) Pozawątrobowa lokalizacja ludzkiego pegiwirusa (HPgV)

W pracach wskazano na potencjalną możliwość HPgV do zakażenia ośrodkowego układu nerwowego, jak również komórek szpiku kostnego.

Wybrane publikacje:

Bukowska-Ośko I, Perlejewski K, Pawełczyk A, Rydzanicz M, Pollak A, Popiel M, **Caraballo Cortés K**, Paciorek M, Horban A, Dzieciatkowski T, Radkowski M, Laskus T. Human pegivirus in patients with encephalitis of unclear etiology, Poland. *Emerging Infectious Diseases*. 2018;24(10):1785-1794.

Kisiel E, **Caraballo Cortes K**, Pawełczyk A, Bukowska-Ośko I, Kubisa N, Laskus T, Radkowski M. Hepatitis G virus/GBV-C in serum, peripheral blood mononuclear cells and bone marrow in patients with hematological malignancies. *Infection, Genetics and Evolution*. 2013;19(1):195-199.

Kisiel E, Pawełczyk A, Chmielewski M, **Caraballo Cortes K**, Bukowska-Ośko I, Fic M, Centkowski P, Warzocha K, Radkowski M. Replication analysis of hepatitis G virus (HGV)/GBV-C in bone marrow of patients with B-cell lymphoproliferative disorders and Hodgkin' s disease. *Experimental and Clinical Hepatology*. 2009;5(3-4):29-31.

e) Zastosowanie metody NGS do analiz metagenomicznych

W pracach wykorzystano metodę NGS do analizy mikrobiomu obecnego w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z chorobami neurologicznymi.

Wybrane publikacje:

Bukowska-Ośko I, Perlejewski K, Nakamura S, Motooka D, Stokowy T, Kosińska J, Popiel M, Płoski R, Horban A, Lipowski D, **Caraballo Cortes K**, Pawełczyk A, Demkow U, Stępień A, Radkowski M, Laskus T. Sensitivity of next-generation sequencing metagenomic analysis for detection of RNA and DNA viruses in cerebrospinal fluid: the confounding effect of background contamination. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016;944:53-62.

Perlejewski K, Bukowska-Ośko I, Nakamura S, Motooka D, Stokowy T, Płoski R, Rydzanicz M, Zakrzewska-Pniewska B, Podlecka-Piętowska A, Nojszewska M, Gogol A, **Caraballo Cortes K**, Demkow U, Stępień A, Laskus T, Radkowski M. Metagenomic analysis of cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016;935:89-98.

f) Klinika i etiologia wirusowych zapaleń mózgu

W pracach badano wirusowe czynniki etiologiczne zapaleń mózgu w Polsce z wykorzystaniem rutynowych badań diagnostycznych: molekularnych i serologicznych, jak również podejścia z wykorzystaniem NGS (analiza metagenomiczna). Przyczyniły się one do lepszego zrozumienia epidemiologii i patogenezы zakażeń OUN.

Wybrane publikacje:

Lipowski D, Popiel M, Perlejewski K, Nakamura S, Bukowska-Ośko I, Rządkiwicz E, Dzieciatkowski T, Milecka A, Wenski W, Ciszek M, Dębska-Ślizień A, Ignacak E, **Caraballo Cortes K**, Pawełczyk A, Horban A, Radkowski M, Laskus T. A cluster of fatal tick-borne encephalitis virus infection in organ transplant setting. *Journal of Infectious Diseases*. 2017;215(6):896-901.

Popiel M, Perlejewski K, Bednarska A, Dzieciatkowski T, Paciorek M, Lipowski D, Jabłonowska M, Czeszko-Paprocka H, Bukowska-Ośko I, **Caraballo Cortes K**, Pawełczyk A, Fic M, Horban A, Radkowski M, Laskus T. Viral etiologies in adult patients with encephalitis in Poland: A prospective single center study. *Plos One*. 2017;12(6):e0178481.

Jabłońska J, Popiel M, Bukowska-Ośko I, Perlejewski K, **Caraballo Cortes K**, Horban A, Demkow U, Laskus T, Radkowski M. No evidence of West Nile virus infection among Polish patients with encephalitis. *Central European Journal of Immunology*. 2016;41(4):383-385.

Perlejewski K, Popiel M, Laskus T, Nakamura S, Motooka D, Stokowy T, Lipowski D, Pollak A, Lechowicz U, **Caraballo Cortes K**, Stępień A, Radkowski M, Bukowska-Ośko I. Next-generation sequencing (NGS) in the identification of encephalitis-causing viruses: unexpected detection of human herpesvirus 1 while searching for RNA pathogens. *Journal of Virological Methods*. 2015;226:1-6.

Wykaz wszystkich opublikowanych prac znajduje się w załączniku nr 3.

6.2. Wyjazdy zagraniczne

Szwajcaria, Zurych, wizytujący naukowiec, Zakład Chorób Zakaźnych i Epidemiologii Szpitalnej Uniwersytetu w Zurychu, udział w projekcie Swiss HIV Cohort Study (SHCS) "Incident Hepatitis C virus

infection in the SHCS - study of the HCV epidemic in HIV-1 infected patients by phylogenetic analyses of the circulating viruses". 1 sierpnia - 27 października 2014

Finlandia, Helsinki University, Viikki Graduate School in Biosciences, Kurs technik inżynierii genetycznej, październik 2006

Hiszpania, Madryt, dział badań i rozwoju, firma Ingenasa (immunologia i genetyka stosowana), staż oparty na programie Leonardo da Vinci, pt. *"Practical Aspects of Biotechnology and Biomedicine"* Luty-czerwiec 2006

Dania, Aarhus, University of Aarhus, Department of Molecular Biology, Laboratory of Cellular Ageing, Stypendium w ramach programu europejskiego Erasmus, Luty-czerwiec 2004

6.3. Kierowanie projektami badawczymi

a) kierownik grantu NCN Sonata pt. „Analiza zależności między "wyczerpaniem" komórek T, zmiennością genów kodujących epitopy wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) rozpoznawane przez komórki T, a wpływem leczenia przeciwwirusowego u pacjentów z zakażeniem HCV oraz współzakażeniem HIV-1/HCV”, lata 2016-2019

b) kierownik projektu Swiss SHCS Cohort Study, pt. „Analysis of relationship between T cell exhaustion, genetic heterogeneity of hepatitis C virus (HCV) and anti-HCV treatment in HIV-1/HCV coinfecting patients”, lata 2015-2018

c) kierownik projektów „Młody Badacz” ze środków statutowych WUM pt.:

- Ocena zależności między występowaniem, specyficznością i stanem funkcjonalnym komórek T CD8+ CD4+ (DPT) a przebiegiem przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C, 2017

- Ocena wpływu zmienności genetycznej wirusa zapalenia wątroby typu C na stan czynnościowy komórek T (wskaźniki wyczerpania immunologicznego), 2014

- Analiza polimorfizmu sekwencji genomu wirusa zapalenia wątroby typu C kodujących epitopy rozpoznawane przez przeciwciała neutralizujące oraz receptory komórek T za pomocą głębokiego sekwencjonowania, 2014

- Zmienność nukleotydowa sekwencji HVR1 E2 wirusa zapalenia wątroby typu C w kontekście skuteczności leczenia przeciwwirusowego, 2012

- Dynamika zmian regionu zmiennego HVR1 (E2) wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) we wczesnym okresie leczenia jako czynnik predykcyjny skuteczności terapii przeciwwirusowej, 2010-11

d) główny wykonawca grantu NCN Opus pt.: „Badanie czynników warunkujących eliminację lub przetrwanie zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) we wczesnej fazie zakażenia: wpływ zmienności genetycznej wirusa oraz odpowiedzi immunologicznej” 2013-obecnie

e) wykonawca projektów „Młody Badacz” ze środków statutowych WUM pt.

- Wykorzystanie sekwencjonowania następnej generacji (NGS) do wykrywania potencjalnych patogenów indukujących stwardnienie rozsiane (SM), 2017-obecnie

- Detekcja oraz charakterystyka wirusa zapalenia wątroby typu G (HGV)/GB typu C (GBV-C) w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z zapaleniem mózgu o nieznannej etiologii, 2016-2018

- Wykorzystanie sekwencjonowania nowej generacji (NGS) do analizy mikrobiomu pacjentów z zaburzeniami odporności, 2015-2017

- Określenie reaktywności komórek układu odpornościowego na antygeny wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) *in vitro* w oparciu o analizę STAT-3 i NF- κ B techniką cytometrii przepływową, 2015-2016

- Występowanie białka NS3 jako markera produktywnego zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) w lokalizacjach pozawątrobowych, 2014-2016

- Wpływ koinfekcji HIV na zmienność wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) w surowicy krwi i komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) u pacjentów w trakcie leczenia interferonem α i rybawiryną, 2014-2015

- Analiza genetyczna regionu 5'UTR wirusa zapalenia wątroby typu G (HGV)/GBV-C w komórkach krwi obwodowej (PBMC) oraz szpiku kostnym przy użyciu metody SSCP, 2013-2014
- Określenie czynnika zakaźnego u pacjentów z objawami wirusowego zapalenia mózgu z wykorzystaniem reprezentatywnej analizy różnicowej (RDA), 2012-2013
- Badanie zaburzeń czynnościowych komórek układu immunologicznego w odpowiedzi na zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) przy użyciu kompleksowej analizy ekspresji genów komórki, 2009-2010

6.4. Współpraca międzynarodowa

a) Zakład Chorób Zakaźnych i Epidemiologii Szpitalnej Uniwersytetu w Zurychu – Prof. Karin Metzner. Współpraca od 2014 roku – obecnie. Współprowadzenie projektu Swiss HIV Cohort Study pt. „Analysis of relationship between T cell exhaustion, genetic heterogeneity of hepatitis C virus (HCV) and anti-HCV treatment in HIV-1/HCV coinfecting patients”, współpraca w ramach grantu Sonata pt.: „Analiza zależności między "wyczerpaniem" komórek T, zmiennością genów kodujących epitopy wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) rozpoznawane przez komórki T, a wpływem leczenia przeciwwirusowego u pacjentów z zakażeniem HCV oraz współzakażeniem HIV-1/HCV”. Brałam także udział w projekcie w ramach stażu podoktorskiego w Zurychu pt.: „Incident hepatitis C virus infection in the Swiss HIV Cohort Study- study of the HCV epidemic in HIV-1 infected patients by phylogenetic analyses of the circulating viruses”.

b) Instytut Wirusologii Medycznej Uniwersytetu w Zurychu – dr Osvaldo Zagordi. Współpraca w latach 2012 – 2018. Cztery wspólne publikacje naukowe.

6.5. Doświadczenie dydaktyczne

6.5.1. Prowadzenie zajęć z następujących przedmiotów:

a) „Choroby zakaźne” dla studentów 3, 4 i 5 roku kierunku lekarskiego, I i II Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

b) „Immunopatologia” dla studentów 2 i 4 roku kierunku Analityka Medyczna, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny

c) „Infectious diseases”, prowadzony w języku angielskim, dla studentów 4 i 5 roku kierunku lekarskiego, II Wydział Lekarski z Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim

d) „Immunology” prowadzony w języku angielskim, dla studentów 1 roku kierunku lekarskiego, II Wydział Lekarski z Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim

6.5.2. Promotorstwo prac licencjackich i magisterskich

Prace licencjackie

Promotor

Eliza Jóźwicka, Wydział Nauk o Zdrowiu WUM, „Wąglik, dżuma, botulizm i ospa prawdziwa jako broń biologiczna – problem medyków, zagrożenie ludzkości”, 2010

Prace magisterskie

Promotor

a) Sylwia Osuch, Wydział Farmacji WUM, „Impact of chronic hepatitis C (CHC) therapy on expression of T-cell exhaustion markers: PD-1, Tim-3 and IL-10”, 2018

b) Klaudia Jóźwiak, Wydział Rolnictwa i Biologii, SGGW, „Wpływ leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu C na stopień ekspresji genów dla markerów „wyczerpania” immunologicznego komórek T krwi obwodowej: PD-1, Tim-3 oraz IL-10”, 2018

Opiekun

a) Alice Sgrò, Wydział Medycyny i Chirurgii, Uniwersytet w Palermo, „Genetic variability of hepatitis C virus HVR1 region in the initial stage of infection”, 2017

b) Krzysztof Maroszek, Wydział Farmacji WUM, „Analiza zmienności regionu hiperzmiennego HVR1 wirusa zapalenia wątroby typu C w powiązaniu ze skutecznością leczenia przeciwwirusowego z wykorzystaniem techniki głębokiego sekwencjonowania”, 2014

6.5.3. Promotorstwo prac doktorskich

Promotor pomocniczy

a) Mgr Maciej Janiak, przewodnik doktorski pracy pt. „Identyfikacja prognostycznych markerów warunkujących przebieg ostrego zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV)” otwarty w październiku 2018

6.5.4. Kierowanie kołem naukowym

W latach 2010-2013 kierowałam kołem naukowym w Zakładzie Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych WUM. W tym czasie koło otrzymało drugą nagrodę w ramach sesji biologii molekularnej na 7th Warsaw International Medical Congress za prezentację wyników pracy “mRNA Cytokine Profiles in Monocytes from Chronic Hepatitis C Virus (HCV)-infected Patients: Effect of Virus Persistence”, Warszawa, 6-8 Maj 2011

6.6. Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową i wyróżnienia

a) Wyróżnienie pracy doktorskiej, Rada I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, 2013

b) Nagroda Studium Medycyny Molekularnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego za obronę pracy doktorskiej wcześniej niż pół roku przed planowanym terminem, 2013

c) Nagroda za najlepszą prezentację wyników projektu doktorskiego w sesji sprawozdawczej Studium Medycyny Molekularnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa, 2012

d) Nagroda III stopnia J.M. Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego za wyróżnienie pracy doktorskiej oraz opublikowanie wyników pracy, 26 Październik 2014

e) Nagrody J.M. Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego za osiągnięcia naukowe:

2017- nagroda III stopnia za współautorstwo pracy pt. „Spouse-to-Spouse transmission and evolution of hypervariable region 1 and 5' Untranslated Region of Hepatitis C virus analyzed by Next-Generation Sequencing”

2016 – nagroda II stopnia za współautorstwo pracy pt. „Genetic Variability of Hepatitis C Virus (HCV) 5' Untranslated Region in HIV/HCV Coinfected Patients Treated with Pegylated Interferon and Ribavirin”

2015 - nagroda III stopnia za współautorstwo pracy pt. „Evidence for immune activation in patients with residual Hepatitis C virus RNA long after successful treatment with IFN and ribavirin”

6.7. Konferencje i doniesienia zjazdowe

2018 Salazar-Vizcaya L, Kouyos R, Metzner K, **Caraballo Cortes K**, Shah C, Böni J, Battegay M, Bernasconi E, Fehr J, Braun D, Calmy A, Cavassini M, Mbunkah H, Keiser O, Rauch A and The Swiss HIV Cohort Study “International versus domestic HCV-transmission in MSM: A perspective for the DAA era”. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Boston, Stany Zjednoczone

2017 Salazar-Vizcaya L, Kouyos R, Metzner K, **Caraballo Cortes K**, Shah C, Böni J, Afegenwi Mbunkah H, Keiser O, Rauch A and The Swiss HIV Cohort Study “Where do Swiss men who have sex with men acquire hepatitis C virus? a molecular epidemiology study”. 21st International Workshop on HIV and Hepatitis Observational Databases, Lizbona, Portugalia

2014 Bukowska-Ośko I, Perlejewski K, Popiel M, Stokowy T, Nakamura S, Motooka D, Lipowski D, Pollak A, Lechowicz U, **Caraballo Cortes K**, Pawełczyk A, Laskus T, Radkowski M. „Application of next-generation sequencing (NGS) for identification of etiological factors in patients with viral encephalitis”. VIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa NEUROINFЕКCJE, Białowieża

2013 Pawełczyk A, Kubisa N, Jabłońska J, Bukowska-Ośko I, **Caraballo Cortes K**, Fic M, Perlejewski K, Kaźmierczak J, Radkowski M. „Występowanie niestrukturalnego białka NS3, jako markera pozawątrobowej replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV), w populacjach jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC)”. I Zjazd Polskiego Towarzystwa Wirusologicznego. III Lubelskie Dni Wirusologiczne, Lublin

2013 **Caraballo Cortes K**, Zagordi O, Ploski R, Perlejewski K, Radkowski M. Deep Sequencing of Hepatitis C Virus Hypervariable Region 1 in Patients Treated with Pegylated Interferon Alpha and Ribavirin. Konferencja "Positive Strand RNA Viruses", Boston, Stany Zjednoczone

2012 Pawełczyk A, **Caraballo Cortes K**, Kisiel E, Kubisa N, Bukowska-Ośko I, Fic M, Radkowski M. "Analysis of hepatitis G virus (HGV/GBV-C) replication in serum, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and bone marrow of hepatitis C virus (HCV)-infected patients". XIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Epidemiologów I lekarzy Chorób Zakaźnych, Wrocław

2012 Pawełczyk A, **Caraballo Cortes K**, Kaźmierczak J, Bukowska-Ośko I, Perlejewski K, Fic M, Radkowski M. „Detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in the serum of seronegative patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL)". XIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Epidemiologów I lekarzy Chorób Zakaźnych, Wrocław

2012 Siernicka M, Ciezar Z, Kucharska T, Maroszek K, Pacek M, Pająk P, Rużycka M, Słowińska N, Stachowiak N, Kaźmierczak J, Kubisa N, Perlejewski K, **Caraballo Cortes K**. Effect of Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Hepatitis C Virus (HCV) exposure on cytokine mRNA expression levels in macrophages in vitro. Konferencja 8th Warsaw International Medical Congress for Young Scientists, Warszawa

2011 Perlejewski K, Skowronska B, Sota J, Zychowska M, Pajak P, Maroszek K, Osinska J, Kucharska T, Machura P, Jozwicka E, Osinska A, **Caraballo Cortes K**, Radkowski M. mRNA Cytokine Profiles in Monocytes from Chronic Hepatitis C Virus-infected Patients: Effect of Virus Persistence, 7th Warsaw International Medical Congress for Young Scientists, Warszawa

6.8. Działalność organizacyjna

a) Jestem powołanym z ramienia WUM członkiem Komisji Egzaminacyjnej Lekarskiego Egzaminu Końcowego (2014-obecnie)

b) Jestem recenzentem sesji Infectious Diseases na Warsaw International Medical Congress (2016-2019)

Karime Caraballo Cortes